

論文の内容の要旨

論文題目

多嚢胞性卵巣症候群の病態における小胞体ストレス応答と Notch シグナルの役割

氏名 小池 洋

1. 研究背景

多嚢胞性卵巣症候群(polycystic ovary syndrome, PCOS)は、生殖年齢女性で最も頻度が高い内分泌・代謝疾患である。表現型は広範なスペクトラムをもち、月経周期異常、排卵障害、不妊症、多毛、にきび、脱毛、肥満、耐糖能異常、心血管障害、悪性腫瘍、抑うつなど多様な症状を呈する。若年女性の不妊原因として重要な位置を占める疾患であるとともに、周産期合併症、2型糖尿病、脂質異常症、精神疾患などの様々な疾病リスクが高くなることが知られており、思春期から閉経後に至るまでライフステージに応じた対応が必要となる。PCOS の診断基準は国際的に使用されているロッテルダム基準があり、(1)希発排卵または無排卵、(2)臨床的または生化学的高アンドロゲン状態、(3)多嚢胞性卵巣の3項目のうち2項目を満たすものとされている。PCOS の卵巣では、卵胞発育異常、主席卵胞の選択障害、排卵障害による多嚢胞性卵巣の像を認める。卵胞発育はゴナドトロピンの協調した分泌に加えて、卵巣局所環境における多くの因子によって調節されており、小胞体ストレスがそのひとつとして注目されている。

小胞体ストレスとは、タンパク質の合成・成熟の場である小胞体に異常なタンパク質が蓄積した状態である。細胞にかかる様々な負荷が小胞体ストレスの誘因になり、細胞は恒常性を保つために、小胞体ストレス応答/UPR (unfolded protein response)と呼ばれる複数のシグナル伝達経路からなる反応を誘導する。この反応によって、新たなタンパク質の合成抑制、小胞体シャペロンによる変性タンパク質の修復、異常タンパク質の分解除去が促進し、小胞体の負荷が軽減されることになる。しかし、小胞体ストレスが長期に及ぶ場合や、負荷が小胞体の処理能力を超えて過剰な場合には、細胞はアポトーシスを誘導して死に至る。小胞体ストレスは卵巣機能を調節する卵巣局所因子として、生理的機能だけでなく PCOS の病態にも深く関わることが報告されている。

卵胞が成熟して排卵に至る過程は下垂体から分泌されるゴナドトロピンによる調節を受けており、さらに、卵巣内の局所因子による細胞間情報伝達が重要な役割を果たしている。細胞間の情報伝達には、細胞同士の接触による情報伝達を担う分子として Notch 受容体が知られており、卵巣における機能が近年明らかになりつつある。Notch シグナルは細胞の分化や増殖を制御することで個体の発生に深く関与し、さらに成体においても多くの細胞の機能に関与することが分かっている。Notch シグナルは、隣接する細胞膜上のリガンドが Notch 受容体と結合することで活性化し、様々な転写因子を誘導して、細胞分化、増

殖などの細胞運命を決定する。卵巣の生理機能、病的状態において、Notch シグナルは重要な役割を持つことが分かっており、PCOS との関連も多数報告されているが、まだ PCOS の病態にどのように関与するのか一致した見解は得られていない。

本研究では、PCOS の卵巣の顆粒膜細胞で生じている小胞体ストレスが Notch シグナルを過剰に活性化させ、適正な細胞間情報伝達が行われなくなることで、排卵に必須の反応である卵丘-卵子複合体の膨化(cumulus-oocyte complex expansion, COC expansion)に異常をきたすという仮説を立てた。この仮説を検証するために、PCOS 患者および PCOS モデルマウスの顆粒膜細胞で Notch シグナル関連分子の発現量を解析した。次に、培養ヒト黄体化顆粒膜細胞(granulosa-lutein cells, GLCs)を用いて、小胞体ストレスが Notch シグナルに及ぼす影響について検証した。続いて、小胞体ストレスは Notch シグナルを介して排卵に関わる遺伝子群の発現量を変化させることを検証した。さらに、その変化が COC expansion に与える影響を、マウスから採取した COC を用いた実験で検証した。最後に、PCOS モデルマウスにおいて、Notch シグナルと COC expansion の変化について検証した。

2. Notch シグナルは PCOS 患者の顆粒膜細胞で活性化している

最初に、PCOS 患者の顆粒膜細胞における Notch シグナルの活性化状態を解析した。体外受精患者の採卵時に GLCs を回収し、Notch2 とそのシグナルの下流で活性化される転写因子である Hey2、Hes1 の mRNA 発現量を qPCR で定量すると、PCOS 患者ではコントロール患者に比べて有意に増加していた。さらに、ヒト卵巣組織を免疫組織化学染色で解析すると、PCOS 患者ではコントロール患者と比較して顆粒膜細胞層の Notch2、Hey2、Hes1 の発現量が有意に増加していた。

3. Notch シグナルは PCOS モデルマウスの顆粒膜細胞で活性化している

PCOS モデルマウスを dehydroepiandrosterone 連日皮下注射することで作成し、卵巣組織切片を免疫組織化学染色で解析した。PCOS 群ではコントロール群に比較して、顆粒膜細胞層における Notch2、Hey2、Hes1 の発現量が有意に増加していた。PCOS モデルマウスにおいても PCOS 患者と一致して Notch2、Hey2、Hes1 の発現量が増加する結果となったことから、PCOS の顆粒膜細胞では Notch シグナルが異常亢進していることが示唆される。

4. 小胞体ストレスは Notch シグナルを誘導する

PCOS の顆粒膜細胞が小胞体ストレスの亢進した状態にあることは既に知られている。小胞体ストレスと Notch シグナルの関係を調べるため、培養ヒト GLCs を用いて、Notch2、Hey2 の mRNA 発現量を qPCR で定量した。小胞体ストレス誘導剤である tunicamycin または thapsigargin を投与すると、Notch2、Hey2 の mRNA の発現量が有意に増加し、これらの変化は小胞体ストレス阻害剤である tauroursodeoxycholic acid (TUDCA)の投与で有意に抑制された。この結果より、培養ヒト GLCs において小胞体ストレスは Notch

シグナルを活性化させることが示唆される。

5. 小胞体ストレスは ATF4 を介して Notch シグナルを誘導する

小胞体ストレスによって誘導される UPR は、ストレスセンサータンパク質である PERK、IRE1、ATF6 の活性化と、その下流に続く ATF4、CHOP、XBP1 など多くの分子の反応によって構成される。どの反応経路が Notch シグナルの活性化に関与しているか調べるために、ATF4 の siRNA を用いたノックダウン実験を行った。培養ヒト GLCs に tunicamycin を投与すると Notch2、Hey2 の mRNA 発現量は有意に増加し、この変化は ATF4 をノックダウンすることで有意に抑制された。この結果から、小胞体ストレスによる Notch シグナルの活性化の一部には、UPR の中でも ATF4 を介した経路に関与していることが示唆される。ATF4 は小胞体ストレス以外の刺激、炎症反応によっても活性化し、ストレスに対する細胞応答を惹起することが知られている。PCOS 卵巣内は小胞体ストレスだけでなく、酸化ストレスや慢性炎症環境にあることも知られており、これらが互いに病態を増悪させる悪循環を形成している可能性がある。

6. 小胞体ストレスは Notch シグナルを介して排卵関連分子を誘導する

小胞体ストレスは Notch シグナルを活性化して排卵に影響を及ぼすかどうか検討するために、培養ヒト GLCs における排卵に関連した遺伝子群の mRNA 発現量の変化を解析した。排卵の過程では、下垂体から分泌される luteinizing-hormone (LH) の作用により顆粒膜細胞で epidermal growth factor (EGF) 関連因子が誘導され、協調のとれた一連の反応が周囲に伝播し、COC expansion と呼ばれる排卵に必須の反応が引き起こされる。ここでは排卵に関わる代表的な分子である Areg、Ereg、Tnfaip6、Has2、COX2 の mRNA 発現量を qPCR で定量した。Human chorionic gonadotropin (hCG) を含む培養液でヒト GLCs を培養し、そこに tunicamycin を投与すると排卵関連遺伝子群の発現量は有意に増加した。同時に Notch シグナル阻害剤である DAPT を投与すると、それらの変化は有意に抑制された。この結果は、小胞体ストレスによって Notch シグナルが活性化し、排卵関連分子群が転写誘導されることを示唆する。

7. 小胞体ストレスは Notch シグナルを介して COC expansion を促進する

小胞体ストレスが Notch シグナルを活性化させて COC expansion に影響を及ぼすかどうか検討するために、マウス胞状卵胞から単離培養した COC を用いて解析を行った。COC expansion の定量的評価は、卵子周囲の卵丘細胞が広がる面積を顕微鏡下に測定することで行った。hCG を含む培養液でマウス COC を培養し、tunicamycin を投与すると COC の広がる面積は有意に増加し、同時に DAPT を投与することでその変化は有意に抑制された。前項の排卵に関連する遺伝子群の mRNA 変化の結果と合わせて考えると、小胞体ストレス応答が Notch シグナルを活性化させ、COC expansion を促進した可能性がある。

8. PCOS モデルマウスでは、Notch シグナルが COC expansion を促進する

PCOS 卵巣の顆粒膜細胞は小胞体ストレスの亢進した状態にあることから、PCOS モデルマウスにおいても、小胞体ストレスによって活性化した Notch シグナルが COC expansion に影響を及ぼすかどうか検討した。マウスに排卵誘発を行い、卵管内より COC を採取して各 COC の広がる面積を測定した。PCOS モデルマウス群の COC 面積はコントロール群より有意に増加していた。PCOS モデルマウスに Notch シグナル阻害剤である DAPT を投与すると、COC 面積の増加は有意に抑制された。この結果より、PCOS モデルマウスでは Notch シグナルが活性化し、COC expansion が亢進していることが示唆される。

9. 結論

本研究では、PCOS の卵巣の顆粒膜細胞において、Notch シグナルが活性化していることを示した。小胞体ストレスは Notch シグナルを活性化し、そこには ATF4 を介した経路が関与していることを示した。続いて、小胞体ストレスによる Notch シグナル活性化は、排卵関連遺伝子の発現量増加と、COC expansion を異常亢進させることを明らかにした。PCOS モデルマウスにおいても、Notch シグナルを介して COC expansion が異常亢進していることを示した。本研究の結果から、卵胞微小環境の小胞体ストレスが Notch シグナルを介した COC 成熟異常を惹起し、PCOS の主要な病態である排卵障害に寄与していることが示唆される。本研究の成果から、小胞体ストレス応答や Notch シグナルの調節を行うことが、PCOS の新たな治療戦略として期待できる。

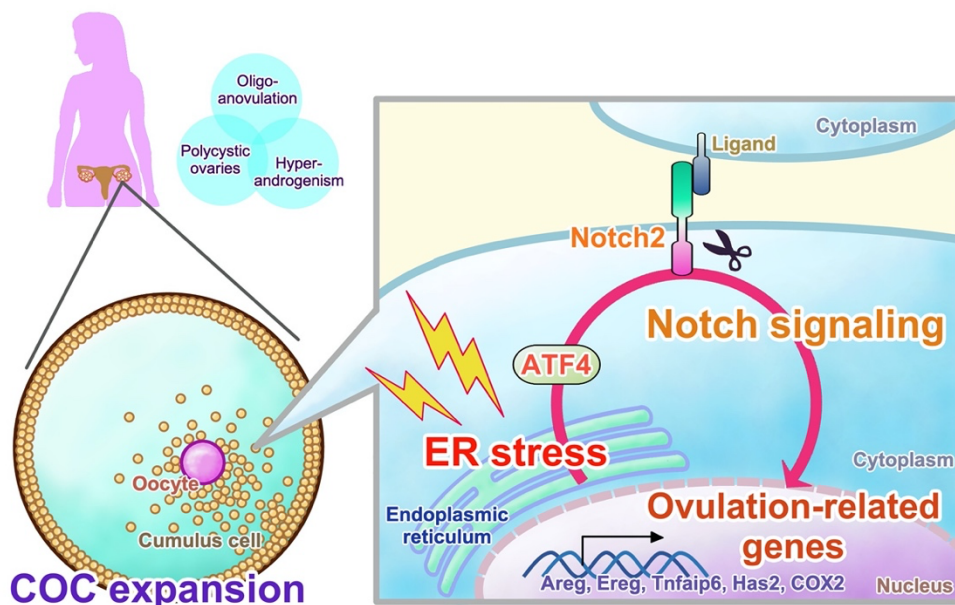


図. PCOS の病態における小胞体ストレス応答と Notch シグナルの役割